

5.1183

PATENT APPLICATION

jc862 U.S. PTO  
09/645321  
08/25/00

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: )  
SATOSHI KOIZUMI, ET AL. ) : Examiner: Not Yet Assigned  
Application No.: N/Y/A ) : Group Art Unit: N/Y/A  
Filed: Currently herewith ) :  
For: PROCESS FOR PRODUCING ) :  
N-ACETYLNEURAMINIC ACID : August 25, 2000

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

CLAIM TO PRIORITY

Sir:

Applicants hereby claim priority under the  
International Convention and all rights to which they are  
entitled under 35 U.S.C. § 119 based upon the following  
Japanese Priority Application:


No. 11-242670 filed August 30, 1999.

A certified copy of the priority document is  
enclosed.

The Examiner is respectfully requested to  
acknowledge receipt of the claim to priority and priority  
document.

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our below listed address.

Respectfully submitted,

  
Attorney for Applicants  
Lawrence S. Perry  
Registration No. 31,865

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO  
30 Rockefeller Plaza  
New York, New York 10112-3801  
Facsimile: (212) 218-2200

LSP\ac

NY\_MAIN 106370 v 1

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

J-862 U.S. PTO  
09/645321



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 8月30日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第242670号

出 願 人

Applicant(s):

協和醗酵工業株式会社

2000年 6月 2日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦

出証番号 出証特2000-3041108

【書類名】 特許願

【整理番号】 H11-0691N2

【提出日】 平成11年 8月30日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 19/02

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

【氏名】 小泉 聡司

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

【氏名】 田畑 和彦

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内

【氏名】 遠藤 徹夫

【発明者】

【住所又は居所】 山口県防府市協和町1番1号 協和醗酵工業株式会社 技術研究所内

【氏名】 尾崎 明夫

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 N-アセチルノイラミン酸の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 水性媒体中に、

- ①N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性またはN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、
- ②上記①においてN-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性を有する微生物を用いた場合にはピルビン酸の生成能を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、上記①においてN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物を用いた場合にはホスホエノールピルビン酸の生成能を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、
- ③N-アセチルマンノサミン、および
- ④ピルビン酸またはホスホエノールピルビン酸の生成に必要なエネルギー源、を存在せしめ、該水性媒体中でN-アセチルノイラミン酸を生成蓄積させ、該水性媒体中からN-アセチルノイラミン酸を採取することを特徴とするN-アセチルノイラミン酸の製造法。

【請求項 2】 N-アセチルマンノサミンが、N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ活性を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、およびN-アセチルグルコサミンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でN-アセチルマンノサミンを生成蓄積させることにより得られるN-アセチルマンノサミンである、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 3】 N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ活性を有する微生物が、N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼをコードするDNAを含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する微生物である、請求項 2 記載の製造法。

【請求項 4】 N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼをコードするDNAがシネコシスティス(Synechocystis)属に属する微生物由来のDNAである、請求項 3 記載の製造法。

【請求項 5】 N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼをコードするD

NAが、以下の（a）または（b）のDNAである、請求項3または4記載の製造法。

（a） 配列番号1記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA

（b） 配列番号2記載の塩基配列を有するDNA

【請求項6】 N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性を有する微生物がエシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物である、請求項1記載の製造法。

【請求項7】 N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物がエシェリヒア属、ナイセリア属およびストレプトコッカス属から選ばれる属に属する微生物である、請求項1記載の製造法。

【請求項8】 ピルビン酸の生成能を有する微生物が、エシェリヒア属、コリネバクテリウム属およびサッカロマイセス属から選ばれる属に属する微生物である、請求項1記載の製造法。

【請求項9】 ホスホエノールピルビン酸の生成能を有する微生物が、エシェリヒア属、コリネバクテリウム属およびサッカロマイセス属から選ばれる属に属する微生物である、請求項1記載の製造法。

【請求項10】 エシェリヒア属に属する微生物がエシェリヒア・コリである、請求項6～9いずれか一項に記載の製造法。

【請求項11】 コリネバクテリウム属に属する微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・グルタミクムおよび、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラムである、請求項6、8または9記載の製造法。

#### 【発明の詳細な説明】

【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性またはN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物を用いたN-アセチルノイラミン酸の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

N-アセチルノイラミン酸の製造法として、抽出法、分解法、酵素を利用した方法等が知られている。

抽出法としては、ウミツバメの巣などからの抽出する方法 [Carbohydrate Research, 56, 423 (1977)] 等が知られている。

【0 0 0 3】

分解法としては、大腸菌などが生産するN-アセチルノイラミン酸ポリマーであるコロミン酸を分解する方法 [J. Biochem., 82, 1425 (1977)] 等が知られている。

酵素を利用した方法としては、N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ、ピルビン酸およびN-アセチルマンノサミンを用いて製造する方法 [J. Am. Chem. Soc., 110, 6481 (1988)、J. Am. Chem. Soc., 110, 7159 (1988)]、アルカリ条件下で、N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ、ピルビン酸およびN-アセチルグルコサミンを用いて製造する方法 (米国特許第5,665,574号)、N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ、N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ、ピルビン酸およびN-アセチルグルコサミンを用いて製造する方法 [Angew. Chem. Int. Ed. Eng., 30, 827 (1991)、Carbohydrate Research, 306, 575 (1998)]、N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ、ホスホエノールピルビン酸およびN-アセチルマンノサミンを用いて製造する方法 [特開平10-4961、Glycobiology, 7, 697 (1997)] が知られている。

【0 0 0 4】

上記N-アセチルノイラミン酸の製造法のいずれの方法においても、操作が煩雑あるいは、高価な原料であるピルビン酸またはホスホエノールピルビン酸を必要とするため、N-アセチルノイラミン酸の安価な製造法は確立されていない。

これまでに、微生物の培養物または該培養物の処理物を利用してN-アセチルノイラミン酸を製造することが可能であることに関する記載あるいは示唆されるものはない。

【0 0 0 5】

N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼに関しては、動植物由来のものが知ら



れており、微生物ではエシェリヒア属に属する微生物にその活性のあることが知られている。エシェリヒア属に属する微生物であるエシェリヒア・コリにおいては、該酵素をコードする遺伝子 *nanA* も知られている [Nucleic Acids Res., 13, 8843 (1985)]。

【0 0 0 6】

N-アセチルノイラミン酸シンセターゼに関しては、エシェリヒア属、ナイセリア属、ストレプトコッカス属に属する微生物等において存在が知られており、エシェリヒア・コリにおいて該酵素をコードする遺伝子 *neuB* が知られている [J. Bacteriol., 177, 312 (1995)]。

【0 0 0 7】

N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼに関しては、ブタおよびラットで該酵素の存在が知られており、ブタ由来の該酵素に関しては性質が調べられ [Biochemistry, 17, 3363 (1970)]、該酵素をコードする遺伝子 [J. Biol. Chem., 271, 16294 (1996)] が取得されている。これまで、該酵素の活性を有する微生物は知られていない。

【0 0 0 8】

ピルビン酸の製造法としては、エシェリヒア・コリの変異株を用いたピルビン酸の製造法が知られている [Biosci. Biotech. Biochem., 58, 2164 (1994)]。

ホスホエノールピルビン酸の製造法としては、サッカロマイセス属などに属する微生物を用いたホスホエノールピルビン酸の製造法が知られている (特開平6-197778)。

【0 0 0 9】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、ピルビン酸、ホスホエノールピルビン酸などの高価な原料を添加することなく、安価にN-アセチルノイラミン酸を製造する方法を提供することにある。また、本発明の目的は、高価なN-アセチルマンノサミンを用いることなくN-アセチルノイラミン酸を製造する方法を提供することにある。

【0 0 1 0】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行い、ピルビン酸またはホスホエノールピルビン酸の生成能を有する微生物を利用することにより、安価な原料から効率的にN-アセチルノイラミン酸が生成することを見出し本発明を完成するに至った。

【0011】

即ち、本発明は以下の(1)～(11)に関する。

(1) 水性媒体中に、

①N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性またはN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、

②上記①においてN-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性を有する微生物を用いた場合にはピルビン酸の生成能を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、上記①においてN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物を用いた場合にはホスホエノールピルビン酸の生成能を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、

③N-アセチルマンノサミン、および

④ピルビン酸またはホスホエノールピルビン酸の生成に必要なエネルギー源、を存在せしめ、該水性媒体中でN-アセチルノイラミン酸を生成蓄積させ、該水性媒体中からN-アセチルノイラミン酸を採取することを特徴とするN-アセチルノイラミン酸の製造法。

【0012】

(2) N-アセチルマンノサミンが、N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、およびN-アセチルグルコサミンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でN-アセチルマンノサミンを生成蓄積させることにより得られるN-アセチルマンノサミンである、上記(1)の製造法。

【0013】

(3) N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有する微生物が、N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNAを含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する微生物である、上記(2)の製造法。

(4) N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼをコードする DNA がシネコシステイス (Synechocystis) 属に属する微生物由来の DNA である、上記 (3) の製造法。

【0014】

(5) N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼをコードする DNA が、以下の (a) または (b) の DNA である、上記 (3) または (4) の製造法。

(a) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA

(b) 配列番号 2 記載の塩基配列を有する DNA

(6) N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性を有する微生物がエシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物である、上記 (1) の製造法。

【0015】

(7) N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物がエシェリヒア属、ナイセリア属およびストレプトコッカス属から選ばれる属に属する微生物である、上記 (1) の製造法。

(8) ピルビン酸の生成能を有する微生物が、エシェリヒア属、コリネバクテリウム属およびサッカロマイセス属から選ばれる属に属する微生物である、上記 (1) の製造法。

【0016】

(9) ホスホエノールピルビン酸の生成能を有する微生物が、エシェリヒア属、コリネバクテリウム属およびサッカロマイセス属から選ばれる属に属する微生物である、上記 (1) の製造法。

(10) エシェリヒア属に属する微生物がエシェリヒア・コリである、上記 (6) ~ (9) いずれか一つに記載の製造法。

【0017】

(11) コリネバクテリウム属に属する微生物がコリネバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・グルタミクムおよび、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラムである、上記 (6)、(8) または (9) の製造法。

以下、本発明を詳細に説明する。

【 0 0 1 8 】

【発明の実施の形態】

本発明で用いられるN-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性を有する微生物としては、該酵素活性を有する微生物であればいずれの微生物も用いることができ、例えばエシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができる。

【 0 0 1 9 】

エシェリヒア属に属する微生物としてはエシェリヒア・コリ等をあげることができる。コリネバクテリウム属に属する微生物としてはコリネバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・グルタミクム、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム等をあげることができる。

また、該酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換体を用いることもできる。該形質転換体として、エシェリヒア・コリ由来の *nanA* 遺伝子〔Nucleic Acids Res., 13, 8843 (1985)〕を含む組換え体DNAを有する微生物をあげることができ、具体的な例として、エシェリヒア・コリNM522/pTA3株等をあげることができる。

【 0 0 2 0 】

本発明で用いられるN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物としては、該酵素活性を有する微生物であればいずれの微生物も用いることができ、例えばエシェリヒア属、ナイセリア属、ストレプトコッカス属に属する微生物をあげることができる。

【 0 0 2 1 】

エシェリヒア属に属する微生物としてはエシェリヒア・コリ等をあげることができる。

また、該酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換体を用いることもできる。該形質転換体として、エシェリヒア・コリ由来の *neuB* 遺伝子〔J. Bacteriol., 177, 312 (1995)〕を含む組換え体DNAを有する微生物をあげることができ、具体的な例として、エシェリヒア・コリNM522/pYP18株等をあげることができる。

## 【0022】

ピルビン酸生成能を有する微生物としては、該生成活性を有する微生物であればいずれの微生物も用いることができ、エシェリヒア・コリ、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・グルタミクム、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム、サッカロマイセス・セレビスエなどを例示することができる。また、変異手法あるいは遺伝子組換え手法により、該活性を増強した微生物を用いることもできる。エシェリヒア・コリの変異株としては、Biosci. Biotech. Biochem., 58, 2164 (1994)記載の株をあげることができる。

## 【0023】

ホスホエノールピルビン酸生成能を有する微生物としては、該生成活性を有する微生物であればいずれの微生物も用いることができ、エシェリヒア・コリ、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・グルタミクム、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム、サッカロマイセス・セレビスエなどを例示することができる。サッカロマイセス・セレビスエとしては、特開平6-197778に記載の株をあげることができる。また、変異手法あるいは遺伝子組換え手法により、該活性を増強した微生物を用いることもできる。

## 【0024】

N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有する微生物としては、該酵素活性を有する微生物であればいずれの微生物も用いることができ、例えば該酵素の活性を遺伝子組換え手法により増強した形質転換体をあげることができる。該形質転換体の具体例として、ブタ由来のN-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ遺伝子を含む組換え体DNA (pEPI1) を保有するエシェリヒア・コリ (FERM BP-4602: 米国特許第5,795,767号) またはシネコシステイス属に属する微生物由来のN-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを保有するエシェリヒア・コリNM522/pYP16株等をあげることができる。

## 【0025】

シネコシステイス属に属する微生物由来のN-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ遺伝子としては、Synechocystis sp. PCC6803株の染色体に存在する、

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている遺伝子をあげることができる。より具体的には、配列番号 2 で示される塩基配列を有する遺伝子(slr1975)をあげることができる。配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび配列番号 2 で示される塩基配列を有する DNA は、後述実施例に従い、本発明者らが初めて取得したものである。

## 【0026】

N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性およびピルビン酸生成能を有する微生物においては、該微生物1種のみを用い、N-アセチルマンノサミンよりN-アセチルノイラミン酸を製造することができる。上記活性あるいは生産能のいずれかが弱いあるいは欠失している微生物においては、弱いあるいは欠失している活性あるいは生産能を補うことのできる微生物と適宜組み合わせることにより、N-アセチルノイラミン酸を製造することができる。

## 【0027】

N-アセチルノイラミン酸の製造において用いることのできるN-アセチルマンノサミンとしては、市販品等の標品をあげることができる。また、N-アセチルグルコサミンから、アルカリ条件下で化学的に、あるいはN-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼを用い酵素的に変換することにより得られるN-アセチルマンノサミンを用いることができる。更に、N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、およびN-アセチルグルコサミンを水性媒体中に存在せしめ、生成蓄積されたN-アセチルマンノサミンを含む標品、または該標品から精製されたN-アセチルマンノサミンを用いることができる。

## 【0028】

N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性およびN-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ活性、並びにピルビン酸生成能を有する微生物においては、該微生物1種のみを用い、N-アセチルグルコサミンよりN-アセチルノイラミン酸を製造することができる。上記活性あるいは生産能のいずれかが弱いあるいは欠失している微生物においては、弱いあるいは欠失している活性あるいは生産能を補うことのできる微生物と適宜組み合わせることにより、N-アセチルノイラ

ミン酸を製造することができる。

N-アセチルノイラミン酸の製造において用いることのできるN-アセチルグルコサミンとしては、市販品等の標品をあげることができる。

【0029】

N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性およびホスホエノールピルビン酸生成能を有する微生物においては、該微生物1種のみを用い、N-アセチルマンノサミンよりN-アセチルノイラミン酸を製造することができる。上記活性あるいは生産能のいずれかが弱いあるいは欠失している微生物においては、弱いあるいは欠失している活性あるいは生産能を補うことのできる微生物と適宜組み合わせることにより、N-アセチルノイラミン酸を製造することができる。

【0030】

N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性およびN-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ活性、並びにホスホエノールピルビン酸生成能を有する微生物においては、該微生物1種のみを用い、N-アセチルグルコサミンよりN-アセチルノイラミン酸を製造することができる。上記活性あるいは生産能のいずれかが弱いあるいは欠失している微生物においては、弱いあるいは欠失している活性あるいは生産能を補うことのできる微生物と適宜組み合わせることにより、N-アセチルノイラミン酸を製造することができる。

【0031】

また、N-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの生成に際して用いる微生物は、増殖を伴った状態で生成反応に供してもよいし、培養終了後の微生物の培養物またはその処理物を生成反応に供してもよい。

上述のように、N-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの製造において、遺伝子組換え微生物を利用することも可能であるが、該遺伝子を含むプラスミドを保有する微生物からのプラスミドDNAの単離精製、プラスミドDNAの制限酵素による切断、切断したDNA断片の単離精製、DNA断片の酵素的結合、組換え体DNAを用いた形質転換等、遺伝子組換えに関する種々の操作は公知の方法〔例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー

・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す) ] に準じて行うことができる。また、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション(以下PCRと略す)は公知の方法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] に従って行うことができる。

【0032】

N-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの製造に関与する遺伝子を宿主内で発現させるためには、該遺伝子を含むDNA断片を、制限酵素類あるいはPCRで該遺伝子を含む適当な長さのDNA断片とした後に、適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入し、次いで上記DNAを挿入した発現ベクターを、発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより達成できる。

【0033】

宿主細胞としては、細菌、酵母等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体への組込が可能で、目的とするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0034】

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、遺伝子の発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、目的とするDNA、転写終結配列、より構成された組換え体DNAであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0035】

発現ベクターとしては、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリンガーマンハイム社より市販)、pKK233-2、pKK223-3、pGEX-2T (いずれもアマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)、pSE280 (インビトロジェン社製)、pGEMEX-1 (プロメガ社製)、pQE-8、pQE-30 (いずれもキアゲン社製)、pET-3 (ノバジェン社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669



(1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK+ (ストラタジーン社製)、pBluescript II SK- (ストラタジーン社製)、pTrs30 [大腸菌JM109/pTrs30(FERM BP-5407)より調製]、pTrs32 [大腸菌JM109/pTrs32(FERM BP-5408)より調製]、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28(宝酒造社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pPAC31 (W098/12343) 等を例示することができる。

## 【0036】

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P trp)、lacプロモーター (P lac)、P<sub>L</sub>プロモーター、P<sub>R</sub>プロモーター、P<sub>SE</sub>プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP trpを2つ直列させたプロモーター、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

## 【0037】

リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の組換え体DNAにおいては、目的とするDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

## 【0038】

原核生物としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli W1485、Escherichia coli NM522、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia

a marcescens, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Brevibacterium immariophilum ATCC14068, Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066, Corynebacterium ammoniagenes, Corynebacterium glutamicum ATCC13032, Corynebacterium glutamicum ATCC14067, Corynebacterium glutamicum ATCC13869, Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870, Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354, Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

【 0 0 3 9 】

組換え体DNAの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394)、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Research, 16, 6127 (1988)] 等をあげることができる。

【 0 0 4 0 】

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE p13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF $\alpha$ 1 プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

【 0 0 4 1 】

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属、ピチア属、キャンディダ属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris、Candida utilis等をあげることができる。

組換え体DNAの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればい

ずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci., US A, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)] 等をあげることができる。

【0042】

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0043】

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、シュクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

【0044】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

【0045】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常5時間～7日間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ

溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【0046】

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0047】

培養物の処理物としては、培養物の濃縮物、培養物の乾燥物、培養物を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品などをあげることができる。

【0048】

N-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの生成において用いられる微生物の量は、用いる各微生物各々について、湿菌体として1~500 g/lであり、好ましくは1~300 g/lである。

【0049】

ピルビン酸またはホスホエノールピルビン酸の生成に必要なエネルギー源としては、生成を促すものであればいずれも用いることができるが、好適にはグルコースやフラクトースなどをあげることができる。

N-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの生成において用いられる水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、微生物の培養液を水性媒体として用いるこ

とができる。

#### 【0050】

N-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの生成において、必要に応じてフィチン酸等のキレート剤、界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン（例えばナイミンS-215、日本油脂社製）などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド（例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製）などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば三級アミンFB、日本油脂社製）などの三級アミン類など、N-アセチルノイラミン酸の生成を促進するものであればいずれでもよく、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常0.1～50 g/lの濃度で用いられる。

#### 【0051】

有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどがあげられ、通常0.1～50 ml/lの濃度で用いられる。

N-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの生成反応は水性媒体中、pH 5～10、好ましくはpH 6～8、20～50℃の条件で1～96時間行う。該生成反応において、必要に応じてATP、MgCl<sub>2</sub>等の無機塩等を添加することができる。

#### 【0052】

水性媒体中に生成したN-アセチルノイラミン酸の定量はDionex社製の糖分析装置などを用いて行うことができる〔Anal. Biochem., 189, 151 (1990)〕。

反応液中に生成したN-アセチルノイラミン酸の採取は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の方法によって行うことができる。

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 【実施例】

【 0 0 5 3 】

実施例 1. エシェリヒア・コリ由来の N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ遺伝子発現株の造成

Escherichia coli W3110(ATCC27325)株をカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法により培養後、該微生物の染色体 DNA を単離精製した。

【 0 0 5 4 】

N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ遺伝子 *n a n A* を含む DNA 断片を配列番号 3 記載の DNA プライマーと配列番号 4 記載の DNA プライマーをパーセプティブ・バイオシステムズ社製 8905 型 DNA 合成機を用いて合成した。上記遺伝子を含む DNA 断片を以下の方法で増幅した。

【 0 0 5 5 】

上記合成 DNA をプライマーとして用い、Escherichia coli W3110(ATCC27325)株の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。PCR は染色体 DNA 0.1  $\mu$ g、プライマー各 0.5  $\mu$ M、Pfu DNA ポリメラーゼ (STRATAGENE 社製) 2.5 units、Pfu DNA ポリメラーゼ用  $\times 10$  緩衝液 (STRATAGENE 社製) 4  $\mu$ l、deoxyNTP 各 200  $\mu$ M を含む反応液 40  $\mu$ l を用い、94℃-1 分間、42℃-2 分間、72℃-3 分間の工程を 1 サイクルとして 30 サイクル繰り返すことにより行った。

【 0 0 5 6 】

該反応液の 1/10 量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量の TE 飽和フェノール/クロロホルム (v o l / v o l) を添加し、混合した。該混合液を遠心分離後、得られた上層に 2 倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80℃に 30 分間放置した。該放置液を遠心分離し DNA の沈殿を得た。

【 0 0 5 7 】

該 DNA の沈殿を 20  $\mu$ l の TE に溶解した。該溶解液 5  $\mu$ l を用い、DNA を制限酵素 H i n d III および B a m HI で切断し、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離した後、ジーンクリーン II キット (バイオ 101 社製) によ

り 0.9 kb の断片を回収した。pUC19 DNA [Gene, 33, 103 (1985)] 0.2  $\mu$ g を制限酵素 Hind III および BamHI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 2.7 kb の断片を回収した。

## 【0058】

該 0.9 kb および 2.7 kb の断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。該連結反応液を用いて、ビルビン酸生産能を有する Escherichia coli NM522 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50  $\mu$ g/ml を含む LB 寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

## 【0059】

生育してきた形質転換体のコロニーより、N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ遺伝子 nanA を保有する形質転換体 Escherichia coli NM522/pTA3 を取得した。該菌株より、公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ遺伝子発現プラスミドである pTA3 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (図 1)。

## 【0060】

## 実施例 2. N-アセチルノイラミン酸の生産

実施例 1 で得た Escherichia coli NM522/pTA3 株をアンピシリン 50  $\mu$ g/ml を含む LB 培地 125 ml の入った 1 L 容バッフル付き三角フラスコに接種し、28℃で 220 rpm の条件で 17 時間培養した。該培養液 125 ml をグルコース 10 g/l、バクトトリプトン (ディフコ社製) 12 g/l、酵母エキス (ディフコ社製) 24 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.3 g/l、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  12.5 g/l、アンピシリン 50  $\mu$ g/ml の組成からなる液体培地 (pH 無調整) 2.5 L の入った 5 L 容培養槽に接種し、37℃で 6 時間、600 rpm、通気量 2.5 L/分の条件で培養を行った。培養中、28%アンモニア水を用いて、培養液の pH を 7.0 に維持した。また、培養途中で必要に応じてグルコースを添加した。該培養液を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

## 【0061】

Escherichia coli NM522/pTA3株湿菌体 50 g/l、フラクトース 65 g/l、N-アセチルマンノサミン 40 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーンS-215 4 g/l、キシレン 10 ml/lの組成からなる反応液30 mlを200 ml容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌(900 rpm)し、32℃で25時間反応を行った。反応中、4N NaOHを用いて、該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じてフラクトース、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ を添加した。

【0062】

反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置(DX-500)を用いて分析し、反応液中に0.34 g/lのN-アセチルノイラミン酸が生成蓄積していることを確認した。

【0063】

実施例3. エシェリヒア・コリ由来のN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ遺伝子発現株の造成

Escherichia coli K235(ATCC13027)株をカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法により培養後、該微生物の染色体DNAを単離精製した。

【0064】

N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ遺伝子neuBを含むDNA断片を配列番号5記載のDNAプライマーと配列番号6記載のDNAプライマーをパーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成機を用いて合成した。上記遺伝子を含むDNA断片を以下の方法で増幅した。

【0065】

上記合成DNAをプライマーとして用い、Escherichia coli K235(ATCC13027)株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。PCRは染色体DNA 0.1  $\mu\text{g}$ 、プライマー各0.5  $\mu\text{M}$ 、Pfu DNAポリメラーゼ(STRATAGENE社製) 2.5 units、Pfu DNAポリメラーゼ用×10緩衝液(STRATAGENE社製) 4  $\mu\text{l}$ 、deoxyNTP各200  $\mu\text{M}$ を含む反応液40  $\mu\text{l}$ を用い、94℃-1分間、42℃-2分間、72℃-3分間の工程を1サイクルとして30サイクル繰り返す。



返すことにより行った。

【0066】

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量のTE飽和フェノール/クロロホルム(1vol/1vol)を添加し、混合した。該混合液を遠心分離後、得られた上層に2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80℃に30分間放置した。該放置液を遠心分離しDNAの沈殿を得た。

【0067】

該DNAの沈殿を20μlのTEに溶解した。該溶解液5μlを用い、DNAを制限酵素C1aIおよびBamHIで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキット(バイオ101社製)により1.0kbの断片を回収した。pPAC31 DNA(W098/12343) 0.2μgを制限酵素C1aIおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に5.5kbの断片を回収した。

【0068】

該1.0kbおよび5.5kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。該連結反応液を用いてホスホエノールピルビン酸生産能を有するEscherichia coli NM522株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50μg/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

【0069】

生育してきた形質転換体のコロニーより、N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ遺伝子neubを保有する形質転換体Escherichia coli NM522/pYP18を取得した。該菌株より、公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ遺伝子発現プラスミドであるpYP18を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した(図2)。

【0070】

実施例4. N-アセチルノイラミン酸の生産

実施例3で得たEscherichia coli NM522/pYP18株をアンピシリン 50μg/

ml を含む LB 培地 125 ml の入った 1 L 容バッフル付き三角フラスコに接種し、28℃で 220 rpm の条件で 17 時間培養した。該培養液 125 ml をグルコース 10 g/l、バクトトリプトン（ディフコ社製）12 g/l、酵母エキス（ディフコ社製）24 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.3 g/l、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  12.5 g/l、アンピシリン 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の組成からなる液体培地（pH 無調整）2.5 L の入った 5 L 容培養槽に接種し、37℃で 4 時間培養した後、40℃で 3 時間、600 rpm、通気量 2.5 L/分の条件で培養を行った。培養中、28% アンモニア水を用いて、培養液の pH を 7.0 に維持した。また、培養途中で必要に応じてグルコースを添加した。

該培養液を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0071】

Escherichia coli NM522/pYP18 株湿菌体 50 g/l、フラクトース 65 g/l、N-アセチルマンノサミン 40 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーン S-215 4 g/l、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌（900 rpm）し、32℃で 19 時間反応を行った。反応中、4N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じてフラクトース、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を添加した。

【0072】

反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置 (DX-500) を用いて分析し、反応液中に 1.4 g/l の N-アセチルノイラミン酸が生成蓄積していることを確認した。

【0073】

実施例 5. N-アセチルノイラミン酸の生産

実施例 3 で得た Escherichia coli NM522/pYP18 株を実施例 2 記載の方法により培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0074】

Corynebacterium ammoniagenes ATCC21170株をグルコース 50 g/l、ポリペプトン（日本製薬社製）10 g/l、酵母エキス（オリエンタル酵母社製）10 g/l、尿素 5 g/l、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/l、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g/l、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$  20 mg/l、L-システイン 20 mg/l、D-パントテン酸カルシウム 10 mg/l、ビタミンB<sub>1</sub> 5 mg/l、ニコチン酸 5 mg/l、およびビオチン 30  $\mu\text{g}$ /l（10N NaOHでpH7.2に調整）の組成からなる液体培地25 mlの入った300 ml容バッフル付き三角フラスコに接種し、28℃、220 rpmの条件で、24時間培養した。

【0075】

該培養液20 mlを上記と同一組成の液体培地250 mlの入った2 L容バッフル付き三角フラスコに接種し、28℃、220 rpmの条件で、24時間培養した。得られた培養液を種培養液として用いた。

該種培養液250 mlを、グルコース 150 g/l、肉エキス（極東製薬社製）5 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 g/l、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 g/l、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20 mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mg/l、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$  20 mg/l（別殺菌）、 $\beta$ -アラニン 15 mg/l（別殺菌）、L-システイン 20 mg/l、ビオチン 100  $\mu\text{g}$ /l、尿素 2 g/l、およびビタミンB<sub>1</sub> 5 mg/l（別殺菌）（10N NaOHでpH7.2に調整）の組成からなる液体培地2.25 Lの入った5 L容培養槽に接種し、32℃、600 rpm、通気量2.5 L/分の条件で24時間培養を行った。培養中、28%アンモニア水を用いて、培養液のpHを6.8に維持した。

【0076】

該培養液を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

Escherichia coli NM522/pYP18株湿菌体 50 g/l、Corynebacterium ammoniagenes ATCC21170株湿菌体 150 g/l、フラクトース 65 g/l、N-ア

セチルマンノサミン 40 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーン S-215 4 g/l、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、32℃ で 6 時間反応を行った。反応中、4N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じてフラクトース、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を添加した。

【0077】

反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置 (DX-500) を用いて分析し、反応液中に 3.1 g/l の N-アセチルノイラミン酸が生成蓄積していることを確認した。

【0078】

実施例 6 シネコシステイス由来の N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ遺伝子発現株の造成

ブタ由来の N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼのアミノ酸配列 [J. Biol. Chem., 271, 16294 (1996)] を Query として、Genbank の Blast Search および *Synechosystis* sp. (PCC6803) 株のゲノム配列のデータベースである CyanoBase (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/>) において相同性検索 (Similarity Search) を行った結果、該アミノ酸配列は renin-binding protein との記載のある *Synechosystis* sp. (PCC6803) 由来の配列 (slr1975) と高い相同性を示した。

【0079】

*Synechosystis* sp. (PCC6803) 株を J. Gen. Microbiol., 111, 1 (1979) に記載の方法で培養後、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法により、該微生物の染色体 DNA を単離精製した。

パーセプティブ・バイオシステムズ社製 8905 型 DNA 合成機を用いて合成した配列番号 7 および 8 に記載の DNA をプライマーとして用いて、*Synechosystis* sp. (PCC6803) 株の染色体 DNA を鋳型として実施例 1 記載の方法に従って PCR 反応を行った。

【0080】

該反応液の 1/10 量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅してい

ることを確認後、残りの反応液と等量のTE [10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA] 飽和フェノール/クロロホルム (1 vol/1 vol) を添加し、混合した。

【0081】

該混合液を遠心分離後、得られた上層に2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80℃に30分放置した。該放置液を遠心分離しDNAの沈殿を得た。

該DNAの沈殿を20  $\mu$  lのTEに溶解した。

該溶解液5  $\mu$  lを用い、DNAを制限酵素C1a IおよびBamHIで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキット (バイオ101社製) により1.0 kbのDNA断片を回収した。

【0082】

pPAC31 DNA 0.2  $\mu$  gを制限酵素C1a IおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に5.5 kbのDNA断片を回収した。

該1.0 kbおよび5.5 kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。

【0083】

該連結反応液を用いてEscherichia coli NM522株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50  $\mu$  g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより、Synechosystis sp.由来のN-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNAを保有する形質転換体Escherichia coli NM522/pYP16を取得した。該菌株より、公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、発現プラスミドであるpYP16を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (図3)。

【0084】

実施例7. N-アセチルノイラミン酸の生産

実施例1で得たEscherichia coli NM522/pTA3株を実施例2記載の方法により培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で

保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0085】

実施例 6 で得た *Escherichia coli* NM522/pYP16 株をアンピシリン 50  $\mu$ g/ml を含む LB 培地 125 ml の入った 1 L 容バッフル付き三角フラスコに接種し、28℃で 220 rpm の条件で 17 時間培養した。該培養液 125 ml をグルコース 10 g/l、バクトトリプトン（ディフコ社製）12 g/l、酵母エキス（ディフコ社製）24 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.3 g/l、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  12.5 g/l、アンピシリン 50  $\mu$ g/ml の組成からなる液体培地（pH 無調整）2.5 L の入った 5 L 容培養槽に接種し、30℃で 4 時間培養した後、40℃で 3 時間、600 rpm、通気量 2.5 L/分の条件で培養を行った。培養中、28% アンモニア水を用いて、培養液の pH を 7.0 に維持した。また、培養途中で必要に応じてグルコースを添加した。

該培養液を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0086】

*Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21170 株を、実施例 5 記載の方法で培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

*Escherichia coli* NM522/pTA3 株湿菌体 50 g/l、*Escherichia coli* NM522/pYP16 株湿菌体 50 g/l、*Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21170 株湿菌体 150 g/l、フラクトース 65 g/l、N-アセチルグルコサミン 180 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーン S-215 4 g/l、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌（900 rpm）し、32℃で 24 時間反応を行った。反応中、4N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じてフラクトース、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を添加した。

【0087】

反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置 (DX-500) を用いて分

析し、反応液中に 1.0 g/l の N-アセチルノイラミン酸が生成蓄積していることを確認した。

【0088】

実施例 8. N-アセチルノイラミン酸の生産

実施例 3 で得た Escherichia coli NM522/pYP18 株および実施例 6 で得た Escherichia coli NM522/pYP16 株を実施例 4 および 7 記載の方法に準じてそれぞれ培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20℃ で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0089】

Escherichia coli NM522/pYP16 株湿菌体 50 g/l、Escherichia coli NM522/pYP18 株湿菌体 50 g/l、フラクトース 65 g/l、N-アセチルグルコサミン 180 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーン S-215 4 g/l、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、32℃ で 11 時間反応を行った。反応中、4N NaOH を用いて、該反応液の pH を 7.2 に維持し、必要に応じてフラクトース、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を添加した。

【0090】

反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置 (DX-500) を用いて分析し、反応液中に 1.3 g/l の N-アセチルノイラミン酸が生成蓄積していることを確認した。

【0091】

実施例 9. N-アセチルノイラミン酸の生産

実施例 3 で得た Escherichia coli NM522/pYP18 株および実施例 6 で得た Escherichia coli NM522/pYP16 株を実施例 4 および 7 記載の方法に準じてそれぞれ培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20℃ で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0092】

Corynebacterium ammoniagenes ATCC21170 株を実施例 5 記載の方法により培養

し、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

Escherichia coli NM522/pYP16株湿菌体 50 g/l、Escherichia coli NM522/pYP18株湿菌体 50 g/l、Corynebacterium ammoniagenes ATCC21170株湿菌体 150 g/l、フラクトース 65 g/l、N-アセチルグルコサミン 180 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーンS-215 4 g/l、キシレン 10 ml/lの組成からなる反応液30 mlを200 ml容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌(900 rpm)し、32℃で24時間反応を行った。反応中、4N NaOHを用いて、該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じてフラクトース、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ を添加した。

【0093】

反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置(DX-500)を用いて分析し、反応液中に4.3 g/lのN-アセチルノイラミン酸が生成蓄積していることを確認した。

【0094】

【発明の効果】

本発明により、ピルビン酸などの高価な原料を添加することなくN-アセチルノイラミン酸を効率的に製造できる。

【0095】

【配列表フリーテキスト】

配列番号3-人工配列の説明：合成DNA

配列番号4-人工配列の説明：合成DNA

配列番号5-人工配列の説明：合成DNA

配列番号6-人工配列の説明：合成DNA

配列番号7-人工配列の説明：合成DNA

配列番号8-人工配列の説明：合成DNA

【0096】



【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> A method for producing N-acetyl Neuraminic acid

<130> H11-0691N2

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0 0 9 7】

<210> 1

<211> 391

<212> PRT

<213> Synechocystis sp. (PCC6803)

<400> 1

Met Ile Ala His Arg Arg Gln Glu Leu Ala Gln Gln Tyr Tyr Gln Ala

1

5

10

15

Leu His Gln Asp Val Leu Pro Phe Trp Glu Lys Tyr Ser Leu Asp Arg

20

25

30

Gln Gly Gly Gly Tyr Phe Thr Cys Leu Asp Arg Lys Gly Gln Val Phe

35

40

45

Asp Thr Asp Lys Phe Ile Trp Leu Gln Asn Arg Gln Val Trp Gln Phe

50

55

60

Ala Val Phe Tyr Asn Arg Leu Glu Pro Lys Pro Gln Trp Leu Glu Ile

65

70

75

80

Ala Arg His Gly Ala Asp Phe Leu Ala Arg His Gly Arg Asp Gln Asp

85

90

95

Gly Asn Trp Tyr Phe Ala Leu Asp Gln Glu Gly Lys Pro Leu Arg Gln

100

105

110

Pro Tyr Asn Val Phe Ser Asp Cys Phe Ala Ala Met Ala Phe Ser Gln

115

120

125

Tyr Ala Leu Ala Ser Gly Ala Gln Glu Ala Lys Ala Ile Ala Leu Gln

130

135

140

Ala Tyr Asn Asn Val Leu Arg Arg Gln His Asn Pro Lys Gly Gln Tyr

145

150

155

160

Glu Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Arg Pro Leu Lys Ser Leu Ala Val Pro

165

170

175

Met Ile Leu Ala Asn Leu Thr Leu Glu Met Glu Trp Leu Leu Pro Pro

180	185	190
Thr Thr Val Glu Glu Val Leu Ala Gln Thr Val Arg Glu Val Met Thr		
195	200	205
Asp Phe Leu Asp Pro Glu Ile Gly Leu Met Arg Glu Ala Val Thr Pro		
210	215	220
Thr Gly Glu Phe Val Asp Ser Phe Glu Gly Arg Leu Leu Asn Pro Gly		
225	230	235 240
His Gly Ile Glu Ala Met Trp Phe Met Met Asp Ile Ala Gln Arg Ser		
245	250	255
Gly Asp Arg Gln Leu Gln Glu Gln Ala Ile Ala Val Val Leu Asn Thr		
260	265	270
Leu Glu Tyr Ala Trp Asp Glu Glu Phe Gly Gly Ile Phe Tyr Phe Leu		
275	280	285
Asp Arg Gln Gly His Pro Pro Gln Gln Leu Glu Trp Asp Gln Lys Leu		
290	295	300
Trp Trp Val His Leu Glu Thr Leu Val Ala Leu Ala Lys Gly His Gln		
305	310	315 320
Ala Thr Gly Gln Glu Lys Cys Trp Gln Trp Phe Glu Arg Val His Asp		
325	330	335

Tyr Ala Trp Ser His Phe Ala Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp Phe Gly

340

345

350

Tyr Leu Asn Arg Arg Gly Glu Val Leu Leu Asn Leu Lys Gly Gly Lys

355

360

365

Trp Lys Gly Cys Phe His Val Pro Arg Ala Leu Trp Leu Cys Ala Glu

370

375

380

Thr Leu Gln Leu Pro Val Ser

385

390

【0098】

<210> 2

<211> 1173

<212> DNA

<213> *Synechocystis* sp. (PCC6803)

<400> 2

atg att gcc cat cgc cgt cag gag tta gcc cag caa tat tac cag gct 48

Met Ile Ala His Arg Arg Gln Glu Leu Ala Gln Gln Tyr Tyr Gln Ala

1

5

10

15

tta cac cag gac gta ttg ccc ttt tgg gaa aaa tat tcc ctc gat cgc 96

Leu His Gln Asp Val Leu Pro Phe Trp Glu Lys Tyr Ser Leu Asp Arg

20

25

30

cag ggg ggc ggt tac ttt acc tgc tta gac cgt aaa ggc cag gtt ttt 144  
Gln Gly Gly Gly Tyr Phe Thr Cys Leu Asp Arg Lys Gly Gln Val Phe

35

40

45

gac aca gat aaa ttc att tgg tta caa aac cgt cag gta tgg cag ttt 192  
Asp Thr Asp Lys Phe Ile Trp Leu Gln Asn Arg Gln Val Trp Gln Phe

50

55

60

gcc gtt ttc tac aac cgt ttg gaa cca aaa ccc caa tgg tta gaa att 240  
Ala Val Phe Tyr Asn Arg Leu Glu Pro Lys Pro Gln Trp Leu Glu Ile

65

70

75

80

gcc cgc cat ggt gct gat ttt tta gct cgc cac ggc cga gat caa gac 288  
Ala Arg His Gly Ala Asp Phe Leu Ala Arg His Gly Arg Asp Gln Asp

85

90

95

ggt aat tgg tat ttt gct ttg gat cag gaa ggc aaa ccc ctg cgt caa 336  
Gly Asn Trp Tyr Phe Ala Leu Asp Gln Glu Gly Lys Pro Leu Arg Gln

100

105

110

ccc tat aac gtt ttt tcc gat tgc ttc gcc gcc atg gcc ttt agt caa 384  
Pro Tyr Asn Val Phe Ser Asp Cys Phe Ala Ala Met Ala Phe Ser Gln

115

120

125

tat gcc tta gcc agt ggg gcg cag gaa gct aaa gcc att gcc ctg cag 432  
Tyr Ala Leu Ala Ser Gly Ala Gln Glu Ala Lys Ala Ile Ala Leu Gln

130

135

140

gcc tac aat aac gtc cta cgc cgt cag cac aat ccc aaa ggt caa tac 480

Ala Tyr Asn Asn Val Leu Arg Arg Gln His Asn Pro Lys Gly Gln Tyr

145 150 155 160

gag aag tcc tat cca ggt act aga ccc ctc aaa tcc ctg gcg gtg ccg 528

Glu Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Arg Pro Leu Lys Ser Leu Ala Val Pro

165 170 175

atg att tta gcc aac ctc acc ctg gag atg gaa tgg tta tta ccg cct 576

Met Ile Leu Ala Asn Leu Thr Leu Glu Met Glu Trp Leu Leu Pro Pro

180 185 190

act acc gtg gaa gag gtg ttg gcc caa acc gtc aga gaa gtg atg acg 624

Thr Thr Val Glu Glu Val Leu Ala Gln Thr Val Arg Glu Val Met Thr

195 200 205

gat ttc ctc gac cca gaa ata gga tta atg cgg gaa gcg gtg acc ccc 672

Asp Phe Leu Asp Pro Glu Ile Gly Leu Met Arg Glu Ala Val Thr Pro

210 215 220

aca gga gaa ttt gtt gat agt ttt gaa ggg cgg ttg ctc aac cca gga 720

Thr Gly Glu Phe Val Asp Ser Phe Glu Gly Arg Leu Leu Asn Pro Gly

225 230 235 240

cac ggc att gaa gcc atg tgg ttc atg atg gac att gcc caa cgc tcc 768

His Gly Ile Glu Ala Met Trp Phe Met Met Asp Ile Ala Gln Arg Ser

245 250 255

ggc gat cgc cag tta cag gag caa gcc att gca gtg gtg ttg aac acc 816

Gly Asp Arg Gln Leu Gln Glu Gln Ala Ile Ala Val Val Leu Asn Thr

260	265	270	
ctg gaa tat gcc tgg gat gaa gaa ttt ggt ggc ata ttt tat ttc ctt			864
Leu Glu Tyr Ala Trp Asp Glu Glu Phe Gly Gly Ile Phe Tyr Phe Leu			
275	280	285	
gat cgc cag ggc cac cct ccc caa caa ctg gaa tgg gac caa aag ctc			912
Asp Arg Gln Gly His Pro Pro Gln Gln Leu Glu Trp Asp Gln Lys Leu			
290	295	300	
tgg tgg gta cat ttg gaa acc ctg gtt gcc cta gcc aag ggc cac caa			960
Trp Trp Val His Leu Glu Thr Leu Val Ala Leu Ala Lys Gly His Gln			
305	310	315	320
gcc act ggc caa gaa aaa tgt tgg caa tgg ttt gag cgg gtc cat gat			1008
Ala Thr Gly Gln Glu Lys Cys Trp Gln Trp Phe Glu Arg Val His Asp			
325	330	335	
tac gcc tgg agt cat ttc gcc gat cct gag tat ggg gaa tgg ttt ggc			1056
Tyr Ala Trp Ser His Phe Ala Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp Phe Gly			
340	345	350	
tac ctg aat cgc cgg gga gag gtg tta ctc aac cta aaa ggg ggg aaa			1104
Tyr Leu Asn Arg Arg Gly Glu Val Leu Leu Asn Leu Lys Gly Gly Lys			
355	360	365	
tgg aaa ggg tgc ttc cac gtg ccc cga gct ctg tgg ctc tgt gcg gaa			1152
Trp Lys Gly Cys Phe His Val Pro Arg Ala Leu Trp Leu Cys Ala Glu			
370	375	380	

act ctc caa ctt ccg gtt agt  
Thr Leu Gln Leu Pro Val Ser  
385 390

1173

【 0 0 9 9 】

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

gtgtaagctt tctgtatggg gtgt

24

【 0 1 0 0 】

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4



gcagggatcc caaccaggca gcggaa

26

【 0 1 0 1 】

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

tttatcgata ttaattaggg ggaatgaatg ag

32

【 0 1 0 2 】

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

tttgatcct cattattccc cctgattttt gaa

33

【 0 1 0 3 】

<210> 7

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 7

taaatcgata tttgtatgat tgcccatcgc cgtcag

36

【 0 1 0 4 】

<210> 8

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 8

aaaggatcct taactaaccg gaagttggag agtttc

36

【図面の簡単な説明】

【図1】はN-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ発現プラスミドpTA3の造成工程を示す。

【図2】はN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ発現プラスミドpYP1

8の造成工程を示す。

【図3】はN-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ発現プラスミドpY P16の造成工程を示す。

【符号の説明】

Amp<sup>r</sup> : アンピシリン耐性遺伝子

P<sub>L</sub> : P<sub>L</sub>プロモーター

cI857 : cI857リプレッサー

P<sub>lac</sub> : lacプロモーター

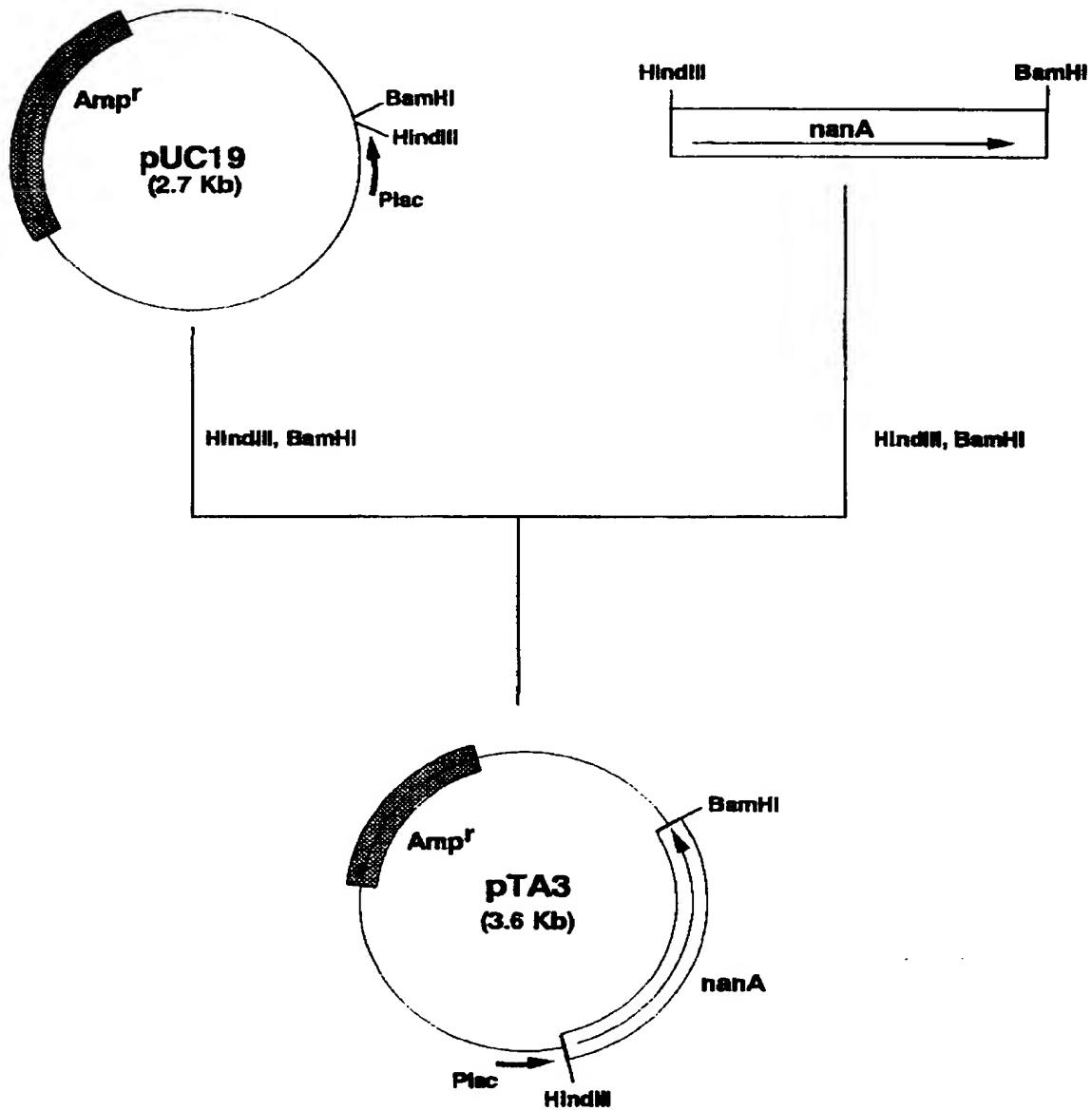
slr1975 : N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ遺伝子

nanA : N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ遺伝子

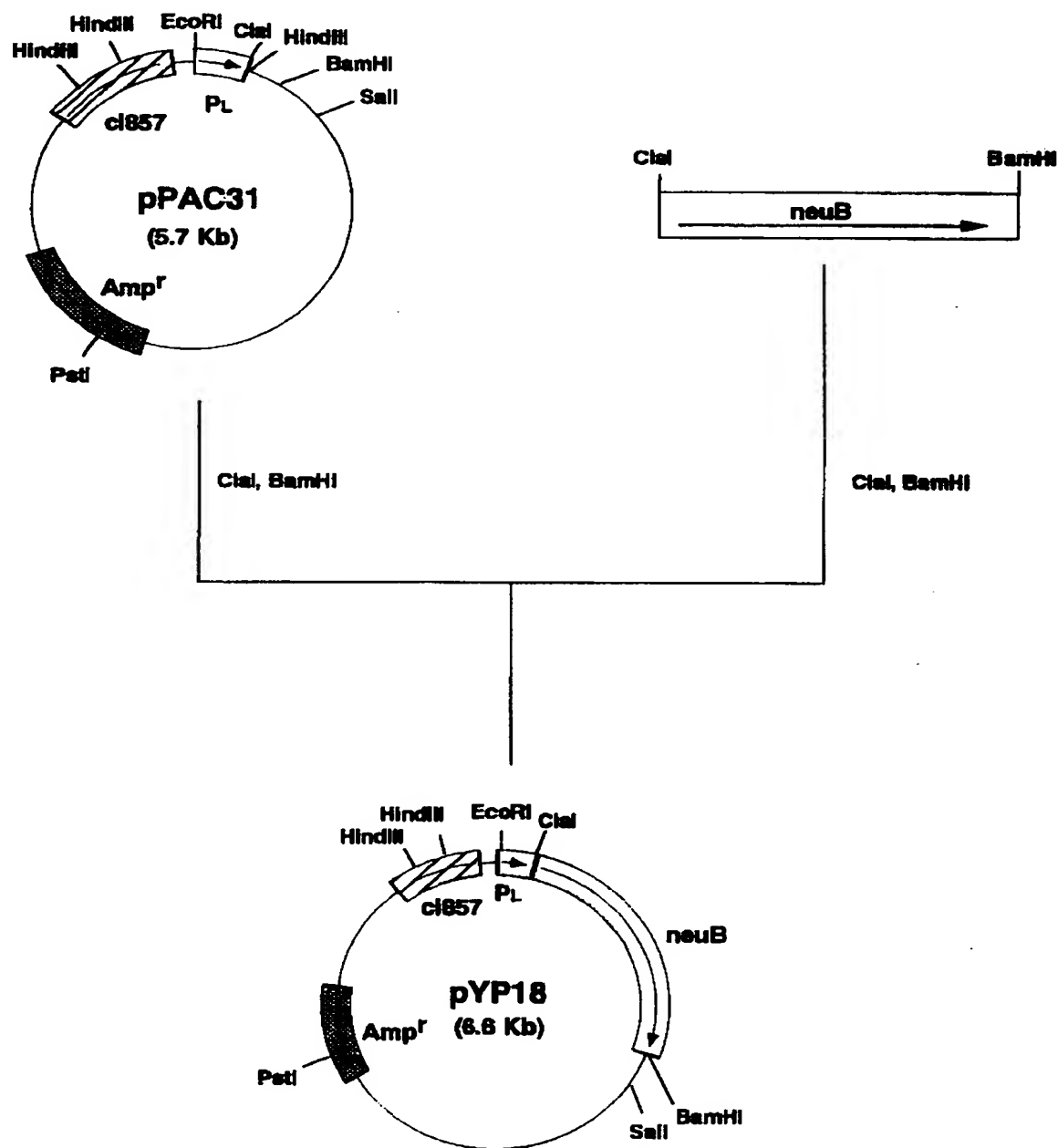
neuB : N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ遺伝子

【書類名】 図面

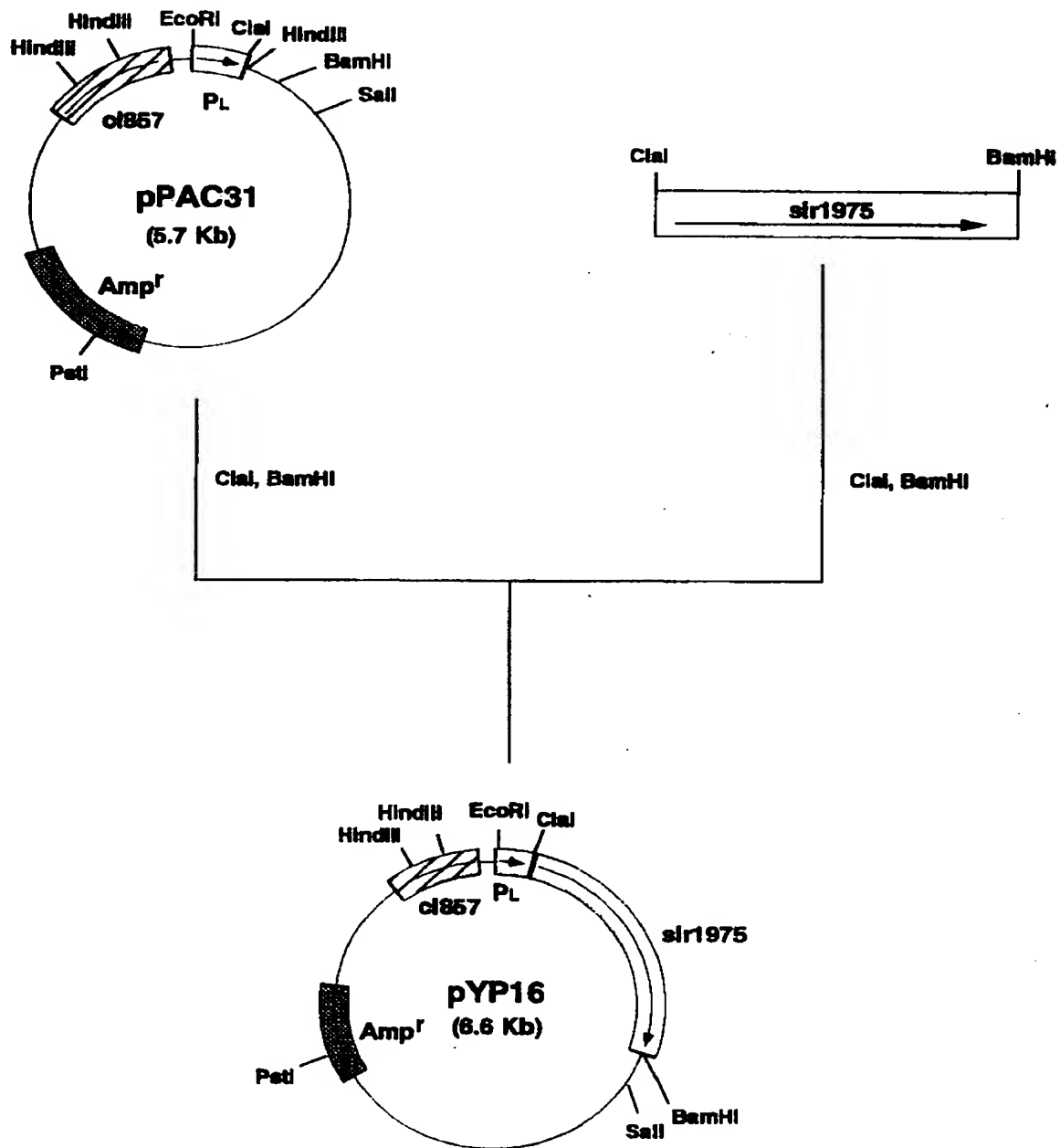
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ピルビン酸、ホスホエノールピルビン酸などの高価な原料を添加することなく、安価にN-アセチルノイラミン酸を製造する方法を提供する。

【解決手段】 本発明によれば、①N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性またはN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、②ピルビン酸の生成能を有する微生物の培養液または該培養液の処理物またはホスホエノールピルビン酸の生成能を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、③N-アセチルマンノサミン、および④ピルビン酸またはホスホエノールピルビン酸の生成に必要なエネルギー源、を存在せしめ、該水性媒体中でN-アセチルノイラミン酸を生成蓄積させ、該水性媒体中からN-アセチルノイラミン酸を採取することを特徴とするN-アセチルノイラミン酸の製造法を提供することができる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 1 0 2 9 ]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 6 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号

氏 名 協和醗酵工業株式会社